



⑯ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 21 204 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68

⑳ Aktenzeichen: 100 21 204.2
㉔ Anmeldetag: 25. 4. 2000
㉕ Offenlegungstag: 8. 11. 2001

DE 100 21 204 A 1

⑦① Anmelder:
Epigenomics AG, 10435 Berlin, DE

⑦② Vertreter:
Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
10119 Berlin

⑦③ Erfinder:
Berlin, Kurt, Dr., 14532 Stahnsdorf, DE; Gut, Ivo
Glynne, Dr., Paris, FR

⑥⑤ Entgegenhaltungen:
US 60 43 031 A
US 60 27 890 A
EP 08 40 804 B1
WO 95 04 160 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑥④ Verfahren zur hochparallelen Analyse von Polymorphismen

⑥⑦ Beschrieben wird ein Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen, insbesondere SNPs, das auch für die gleichzeitige oder separate Detektion von DNA-Methylierung eingesetzt werden kann. Zuerst bindet man einen Satz von Sonden, der mit mindestens einer für die jeweilige Sonde charakteristischen nachweisbaren Markierung versehen ist, an eine adressierte Oberfläche, wobei die erzeugte Bindung der Sonden an die Oberfläche photochemisch, chemisch oder enzymatisch wieder spaltbar ist. Anschließend hybridisiert man eine zu untersuchende Nukleinsäure an diese Sonden, verändert die Sonden in einer allelspezifischen enzymatischen Reaktion und entfernt einen Teil der Sonden, der für die Analyse der allelspezifischen Reaktion bedeutungslos ist. Zuletzt analysiert man die allelspezifischen Produkte anhand der nachweisbaren Markierungen und führt eine Bestimmung der vorhandenen Allele in der abgefragten Nukleinsäureprobe durch.

BEST AVAILABLE COPY

DE 100 21 204 A 1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Analyseverfahren mit hohem Durchsatz zur parallelen Charakterisierung von Polymorphismen, insbesondere SNPs. Gleichzeitig oder in einem separaten Experiment kann das Verfahren zur Analyse von DNA-Methylierung eingesetzt werden.

[0002] Das Humangenomprojekt, die Erstsequenzierung des menschlichen Genoms, wird in den nächsten Jahren abgeschlossen sein. Durch dieses Projekt wird es möglich werden, alle etwa 100.000 Gene zu identifizieren. Die Sequenzinformation öffnet ungeahnte Möglichkeiten für die Aufklärung der Genfunktionen. Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit, Pharmakogenetik und Pharmakogenomik zu betreiben. Die Pharmakogenetik und Pharmakogenomik zielt auf den Einsatz von Medikamenten in Abhängigkeit eines Genotypen. Dadurch soll die Effektivität von Medikamenten gesteigert werden. Der notwendige Zwischenschritt ist die Bestimmung der Polymorphismen und Genotypen, die mit einem bestimmten Ansprechen assoziiert sind. Verlangt werden deshalb immer effizientere Genotypisierungsmethoden.

[0003] Derzeit gibt es zwei Kategorien von polymorphen Markern, die zur Genotypisierung eingesetzt werden, Mikrosatelliten und Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Mikrosatelliten sind hoch polymorph, d. h. sie haben eine Vielzahl von Allelen. Sie sind dadurch charakterisiert, dass ein repetitives Sequenzelement, mit einer unterschiedlichen Anzahl Wiederholungen für unterschiedliche Allele, von konservierten Sequenzen flankiert ist. Durchschnittlich gibt es einen Mikrosatellitenmarker pro 1 Million Basen. Eine Karte von 5.000 positionierten Mikrosatellitenmarkern wurde von CEPH publiziert (Dil. C., et al. Nature, March 14, 1994). Mikrosatelliten werden durch die Größenbestimmung von Produkten einer PCR mit Primern der konservierten, flankierenden Sequenz genotypisiert. Die fluoreszenzmarkierten PCR Produkte werden auf Gelen aufgetrennt.

[0004] Es gibt vergleichsweise wenige beschriebene SNP Marker. Eine Karte mit 300.000 SNP Markern wird derzeit vom SNP Konsortium entwickelt und wird öffentlich zugänglich sein.

[0005] Es gibt eine Handvoll Genotypisierungsmethoden für SNPs. Einige basieren auf der Auftrennung von Produkten auf Gelen, wie der oligonucleotide ligase assay (OLA). Er eignet sich daher eher für den mittleren Durchsatz. Andere vertrauen auf reine Hybridisierung, die jedoch nicht die gleiche Stringenz hat. DNA Arrays (DNA chip) eignen sich für die Analyse einer grossen Anzahl SNPs in einer beschränkten Anzahl von Individuen. Bis jetzt sind Beispiele gezeigt worden, in denen 1.500 SNPs auf einem DNA Chip genotypisiert wurden. Die wirkliche Stärke von DNA Chips liegt in Ansätzen, wie der Resequenzierung und der Expressionsanalyse. Ansätze, welche Primerverlängerung anwenden sind gezeigt worden. Diese haben den Vorteil, dass wenn mit fluoreszenzmarkierten Terminatorbasen gearbeitet wird, die Resultate mit einem einfachen ELISA Lesegerät gesammelt werden können.

[0006] Es gibt einige SNP Genotypisierungsmethoden, die Massenspektrometrie zur Analyse verwenden. Diese haben den wesentlichen Vorteil, dass die allelspezifischen Produkte eine physische Darstellung der Produkte sind und kein fluoreszierendes Signal, dass indirekt dem Produkt zugeordnet werden muss.

[0007] Eine Methode, die kürzlich vorgestellt wurde, ist der Invader Assay und als Variante davon der Invader Squared (T. Griffin and L. M. Smith Proceedings of the ASMS 1998). Für diese Methode werden mindestens zwei Oligonukleotide verwendet, die einen bekannten SNP abdecken.

Ein Oligonukleotid deckt die Sequenz von der 5'-Seite bis unmittelbar zum SNP hin ab, so dass sich der SNP an das 3'-Ende dieses Oligonukleotids anschliesst. Meistens werden zwei weitere Oligonukleotide, von denen jeder ein Allel des Polymorphismus abdeckt und einen unterschiedliche 5'-Überhang hat, an das System hybridisiert. Eine strukturelle Endonuklease entfernt vom vollständig komplementären Oligonukleotid den 5'-Überhang. Der abgekuppelte Überhang wird mittels Massenspektrometrie analysiert und zur Identifikation des Allels verwendet. Ein Nachteil der gezeigten Methode ist, dass die Produkte vor der massenspektrometrischen Analyse gründlich gereinigt werden müssen. Für diese Aufreinigung werden magnetic beads verwendet, die nicht einfach in der Handhabung sind. Dies ist ein wesentlicher Nachteil von vielen Genotypisierungsmethoden, die Massenspektrometrie zur Analyse verwenden.

[0008] Eine weitere Genotypisierungsmethode ist der Taq Man Assay. In diesem wird allelspezifisch enzymatisch ein Fluoreszenzlöcher von einem fluoreszenzfarbstofftragenden Oligonukleotid getrennt.

[0009] Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI) hat die Analytik von Biomolekülen revolutioniert (Karas, M. & Hillenkamp, F. Anal. Chem. 60, 2299-2301 (1988)). MALDI ist in verschiedenen Varianten zur Analyse von DNA eingesetzt worden. Die Varianten reichen von primer extension bis Sequenzierung (Liu, Y.-H., et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 735-743 (1995); Ch'ang, L.-Y., et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 772-774 (1995); Little, D. P., et al. J. Mol. Med. 75, 745-750 (1997); Haff, L. & Smirnov, I. P. Genome Res. 7, 378-388 (1997); Fei, Z., Ono, T. & Smith, L. M. Nucleic Acids Res. 26, 2827-2828 (1998); Ross, P., Hall, L., Smirnov, I. & Haff, L. Nature Biotech. 16, 1347-1351 (1998); Ross, P. L., Lee, K. & Belgrader, P. Anal. Chem. 69, 4197-4202 (1997); Griffin, T. J., Tang, W. & Smith, L. M. Nature Biotech. 15, 1368-1372 (1997)). Der grösste Nachteil dieser Methoden ist, dass alle eine gründliche Aufreinigung der Produkte vor der MALDI Analyse bedingen. Spin column Aufreinigung oder der Einsatz von magnetic bead technology oder reversed-phase Aufreinigung sind notwendig.

[0010] Die Analyse von DNA im MALDI ist stark abhängig vom Ladungszustand des Produktes. Eine 100-fache Verbesserung der Empfindlichkeit in der MALDI Analyse kann dadurch erzielt werden, dass der Ladungszustand auf dem zu analysierenden Produkt so kontrolliert wird, dass nur eine einzige positive oder negative Überschussladung vorhanden ist. So modifizierte Produkte sind auch wesentlich weniger anfällig auf die Ausbildung von Addukten (z. B. mit Na und K, Gut, I. G. and Beck, S. (1995) Nucleic Acids Res., 23, 1367-1373; Gut, I. G., Jeffery, W. A., Pappin, D. J. C. and Beck, S. Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 43-50 (1997)). Ein SNP Genotypisierungsverfahren, welches von diesen Bedingungen Gebrauch macht, mit dem Namen "GOOD Assay" wurde kürzlich vorgestellt (Sauer, S. et al., Nucleic Acids Research, Methods online, 2000, 28, e13). Nachteil ist, dass das gesamte Verfahren einen beschränkten Multiplexierungsgrad zulässt, und die Probenvorbereitung immer den Einsatz modernster und teurer Pipettentechnologie bedingt.

[0011] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur hochparallelen Genotypisierung von Polymorphismen zur Verfügung zu stellen.

[0012] Die Aufgabe wird durch ein Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen gelöst, wobei man die folgenden Schritte ausführt:

a) man bindet einen Satz von Sonden, der mit minde-

stens einer für die jeweilige Sonde charakteristischen nachweisbaren Markierung versehen ist, an eine adressierte Oberfläche, wobei die erzeugte Bindung der Sonden an die Oberfläche photochemisch, chemisch oder enzymatisch wieder spaltbar ist;

b) man hybridisiert eine zu untersuchende Nukleinsäure an diese Sonden;

c) man verändert die Sonden in einer allelspezifischen enzymatischen Reaktion;

d) man entfernt einen Teil der Sonden, der für die Analyse der allelspezifischen Reaktion bedeutungslos ist;

e) man analysiert die allelspezifischen Produkte anhand der nachweisbaren Markierungen und führt eine Bestimmung der vorhandenen Allele in der abgefragten Nukleinsäureprobe durch.

[0013] Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Verfahren wobei die Adresse der Oberfläche in Schritt a) die Position (Oligonukleotidarray), eine Farbe, eine Fluoreszenzmarkierung, eine isotopische Markierung, eine chemische Markierung oder eine radioaktive Markierung ist.

[0014] Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Sonden Oligonukleotide, modifizierte Oligonukleotide, peptide nucleic acids (PNAs), Chimäre dieser Verbindungsklassen oder andere Substanzen sind, die sequenzspezifisch mit DNA wechselwirken.

[0015] Auch ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Sonden über reversible Bindungssysteme an die Oberfläche bindet. Erfindungsgemäß bevorzugt ist auch, dass die zu untersuchende Nukleinsäuren in Schritt b) genomische DNA, klonierte DNA, cDNA, RNA, PCR Produkte oder Ligationsprodukte sind.

[0016] Bevorzugt ist ferner, dass die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templates mittels einer Polymerase und Nukleotidbausteinen zu spezifischen Produkten, entsprechend Schritt c) umgesetzt werden.

[0017] Besonders bevorzugt ist auch, dass man durch gleichzeitigen Einsatz von Desoxy- und Didesoxynukleotidbausteinen eine Sequenzierung durchführt und nicht nur Polymorphismen detektiert.

[0018] Insbesondere ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templates mittels einer Ligase und einem phosphorylierten Oligonukleotid zu spezifischen Produkten, entsprechend Schritt c) umsetzt.

[0019] Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templates mittels eines Helferoligonukleotids und einer strukturalaktiven Endonuklease allelspezifisch schneidet. Weiterhin bevorzugt ist auch, dass man die allelspezifischen Produkte mittels Massenspektrometrie analysiert.

[0020] Ganz besonders ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder Elektrospray Ionisations Massenspektrometrie zur Analyse verwendet wird.

[0021] Dabei ist es bevorzugt, dass die allelspezifischen Produkte in einer Art vorliegen, die sich besonders gut zur massenspektrometrischen Analyse eignen.

[0022] Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die allelspezifischen Produkte gemäß Schritt d) mittels einer enzymatischen oder chemischen Methode verkürzt. Dabei ist besonders bevorzugt, dass die besonders gute Eignung zur massenspektrometrischen Analyse dadurch zustande kommt, dass die allelspezifischen Produkte netto einfach positiv oder einfach negativ geladen sind. Weiterhin ist hierbei bevorzugt, dass eine chemische Reaktion zur Neu-

tralisierung von Ladungen eingesetzt wird, die ansonsten zu einer neutralen oder mehrfach negativen Nettoladung des Produktes beitragen würden. Somit ist auch bevorzugt, dass man Phosphatgruppen, Thiophosphatgruppen, oder Dithiophosphatgruppen des Oligonukleotidrückgrats durch eine selektive Alkylierungsreaktion ladungsneutralisiert. Besonders ist auch erfindungsgemäß bevorzugt, dass die einfache Ladung erfindungsgemäß dadurch zu stande kommt, dass man eine chemische Funktion einbringt, welche die Ladung trägt.

[0023] Bevorzugt ist insbesondere auch, dass die reversible Bindungsschemie durch einen induzierten Bruch die einfache Ladung zum Produkt beisteuert. Dabei ist bevorzugt, dass der induzierte Bindungsbruch chemisch oder photochemisch zustande kommt. Weiterhin ist dabei bevorzugt, dass der induzierte Bindungsbruch während eines Desorptionsprozesses des Analysevorgangs stattfindet.

[0024] Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugt ist es, dass man eine Matrix auf die Oberfläche aufbringt, welche die Desorption im MALDI Prozess unterstützt. Dabei ist wiederum bevorzugt, dass der induzierte Bindungsbruch durch die Matrix induziert wird.

[0025] Bevorzugt ist erfindungsgemäß ferner, dass auf einem adressierten Analysepunkt der Oberfläche eine Vielzahl von unterschiedlichen Sonden sind. Weiterhin ist bevorzugt, dass allelspezifische Produkte der Sonden durch die allelspezifische Reaktion nach Schritt c) nach Abspaltung von der Oberfläche in der Analyse eine eindeutige Masse als nachweisbare Markierung ergeben. Außerdem ist bevorzugt, dass allelspezifische Produkte der Sonden durch die allelspezifische Reaktion nach Schritt c) nach Abspaltung von der Oberfläche in der Analyse ein eindeutiges Muster von Fragmentmassen als nachweisbare Markierung ergeben. Insbesondere bevorzugt ist hierbei, dass die Massen aller Produkte oder Produktfragmente der allelspezifischen Reaktionen einen eindeutigen Rückschluss auf die in der abgefragten Nukleinsäure vorhandenen Allele zulassen.

[0026] Erfindungsgemäß bevorzugt ist auch, dass bekannte Polymorphismen in der zu untersuchenden DNA genotypisiert werden.

[0027] Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man unbekannte Polymorphismen in der zu untersuchenden DNA identifiziert.

[0028] Erfindungsgemäß bevorzugt ist auch, dass man Cytosin-Methylierungen detektiert und visualisiert.

[0029] Ganz besonders ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die chemische Behandlung der DNA mit einer Bisulfidlösung (Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt.

[0030] Bevorzugt ist auch, dass die Amplifikation mittels der Polymerasereaktion (PCR) erfolgt.

[0031] Weiterhin ist bevorzugt, dass bekannte Methylierungsmuster in der zu analysierenden Probe nach der erfindungsgemäß vorbehandelten DNA untersucht werden.

[0032] Das erfindungsgemäße Verfahren übertrifft die Effizienz bestehender Verfahren, in Bezug auf die Einfachheit der Handhabung, die Kosten, die Qualität und den Durchsatz, bei weitem.

[0033] Die Erfindung beschreibt somit ein Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen.

[0034] Im ersten Schritt des Verfahrens wird ein Satz von Sonden an eine adressierte Oberfläche gebunden.

[0035] Man setzt als Sonden vorzugsweise Oligonukleotide, modifizierte Oligonukleotide, peptide nucleic acids (PNAs), Chimäre dieser Verbindungsklassen oder andere Substanzen ein, die sequenzspezifisch mit DNA wechselwirken.

[0036] Die jeweilige Sonde ist mit einer charakteristischen nachweisbaren Markierung versehen. Besonders be-

vorzugt ist diese Markierung die Masse eines Fragments der Sonde.

[0037] In einer bevorzugten Variante des Verfahrens ist die Adressierung der Oberfläche die Position (Oligonukleotidarray), eine Farbe, eine Fluoreszenzmarkierung, eine isotopische Markierung, eine chemische Markierung oder eine radioaktive Markierung.

[0038] Die erzeugte Bindung der Sonden an die Oberfläche ist photochemisch, chemisch oder enzymatisch wieder spaltbar.

[0039] In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind die Sonden über reversible Bindungssysteme an die Oberfläche gebunden.

[0040] Im zweiten Verfahrensschritt hybridisiert man die zu untersuchende Nukleinsäure, die vorzugsweise aus genomischer DNA, klonierter DNA, vorbehandelter DNA, cDNA, RNA, PCR Produkten oder Ligationsprodukten besteht, an die besagten Sonden.

[0041] Bevorzugt wird die DNA zuvor mit einer Bisulfatlösung (Disulfid, Hydrogensulfid) behandelt.

[0042] Im dritten Verfahrensschritt verändert man die Sonden in einer allelspezifischen enzymatischen Reaktion.

[0043] In einer bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templates mittels einer Polymerase und Nukleotidbausteinen zu spezifischen Produkten umgesetzt.

[0044] In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templates mittels einer Ligase und einem phosphorylierten Oligonukleotid zu spezifischen Produkten umgesetzt.

[0045] Anschließend werden die Sonden bevorzugt in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templates mit einem Helferoligonukleotid und einer strukturalaktiven Endonuklease allelspezifisch geschnitten.

[0046] In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens lassen sich dabei Methylierungsmuster in der zu analysierenden vorbehandelten DNA untersuchen.

[0047] In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens werden SNPs in der zu analysierenden vorbehandelten DNA untersucht.

[0048] Auf einem adressierten Analysepunkt der Oberfläche befinden sich vorzugsweise eine Vielzahl von unterschiedlichen Sonden.

[0049] Im vierten Verfahrensschritt entfernt man einen Teil der Sonden, der für die Analyse der allelspezifischen Reaktion bedeutungslos ist.

[0050] Die allelspezifischen Produkte werden dabei vorzugsweise mit einer enzymatischen oder chemischen Methode verkürzt.

[0051] Im fünften Verfahrensschritt analysiert man die allelspezifischen Produkte anhand der nachweisbaren Markierungen und führt die Bestimmung der vorhandenen Allele in der abgefragten Nukleinsäureprobe durch.

[0052] In einer bevorzugten Variante des Verfahrens werden die allelspezifischen Produkte mittels Massenspektrometrie analysiert.

[0053] Die allelspezifischen Produkte liegen vorzugsweise in einer Art vor, die sich besonders gut zur massenspektrometrischen Analyse eignet.

[0054] Bevorzugt kommt die besonders gute Eignung zur massenspektrometrischen Analyse dadurch zustande, dass die allelspezifischen Produkte netto einfach positiv oder einfach negativ geladen sind.

[0055] In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird eine chemische Reaktion zur Neutralisierung von Ladungen eingesetzt, die ansonsten zu einer neutralen oder mehrfach

negativen Nettoladung des Produktes beitragen würde.

[0056] In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens werden Phosphatgruppen, Thiophosphatgruppen oder Dihiophosphatgruppen des Oligonukleotidrückgrats durch eine selektive Alkylierungsreaktion ladungsneutralisiert.

[0057] In einer bevorzugten Variante des Verfahrens kommt die einfache Ladung dadurch zustande, dass eine chemische Funktion eingebracht wird, die die Ladung trägt.

[0058] Die reversible Bindungsschemie steuert vorzugsweise die einfache Ladung durch einen induzierten Bruch zum Produkt bei.

[0059] In einer bevorzugten Variante des Verfahrens kommt der induzierte Bindungsbruch chemisch oder photochemisch zustande.

[0060] In einer weiteren bevorzugten Variante findet der induzierte Bindungsbruch während des Desorptionsprozesses des Analysenvorgangs statt.

[0061] Eine Matrix wird bevorzugt auf die Oberfläche aufgebracht, die die Desorption im MALDI Prozess unterstützt.

[0062] In einer weiteren bevorzugten Variante wird der induzierte Bindungsbruch durch die Matrix induziert.

[0063] In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder Elektronenspray Ionisations Massenspektrometrie zur Analyse verwendet.

[0064] In einer bevorzugten Variante des Verfahrens ergeben die Verlängerungsprodukte der Sonden durch die allerspezifische Reaktion nach Abspaltung von der Oberfläche in der Analyse eine eindeutige Masse als nachweisbare Markierung. Bekannte Polymorphismen lassen sich damit vorzugsweise in der zu untersuchenden DNA identifizieren.

[0065] In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens ergeben die Verlängerungsprodukte der Sonden durch die allerspezifische Reaktion nach Abspaltung von der Oberfläche in der Analyse ein eindeutiges Muster von Fragmentmassen als nachweisbare Markierung. Unbekannte Polymorphismen lassen sich damit vorzugsweise in der zu untersuchenden DNA identifizieren.

[0066] Die Massen aller Produkte der Reaktionen lassen einen eindeutigen Rückschluss auf die in der abgefragten Nukleinsäure vorhandenen Allele zu.

[0067] Das Verfahren wird abschließend durch die Abbildungen erläutert.

[0068] Anhand der Figuren wird die Erfindung näher erläutert.

[0069] Es zeigen:

[0070] Fig. 1a und 1b eine Veranschaulichung der Verfahrensschritte an einem Beispiel und

[0071] Fig. 2 ein mögliche Immobilisierung der Sonden an der Oberfläche umfassend einen photolabilen Linker.

[0072] In den Fig. 1a und 1b werden folgende Schritte dargestellt:

1. Zuerst wird eine Sonde an die adressierte Oberfläche gebunden.
2. Dann hybridisiert man die zu untersuchende Nukleinsäure an die Sonde.
3. Darauf verlängert man die Sonden in einer allerspezifischen Reaktion.
4. Die zu untersuchende Nukleinsäure wird entfernt.
5. Nachfolgend entfernt man einen Teil der Sonden, der für die allerspezifische Reaktion bedeutungslos ist.
6. Abschließend analysiert man den verbleibenden Teil der verlängerten Sonden. Bevorzugt wird zur Analyse ein Massenspektrometer verwendet, das die verlängerten Sonden anhand ihrer Massen identifiziert und

das gleichzeitig die Ablösung von der Oberfläche ermöglicht (z. B. photolytische Reaktion in einem Laser-Desorptions-Massenspektrometer).

[0073] Fig. 2 stellt die eine mögliche Verknüpfung der Primer mit der Oberfläche dar. Das abgebildete Nukleotid ist Teil des Primers, welcher der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen, wobei man die folgenden Schritte ausführt:
 - a) man bindet einen Satz von Sonden, der mit mindestens einer für die jeweilige Sonde charakteristischen nachweisbaren Markierung versehen ist, an eine adressierte Oberfläche, wobei die erzeugte Bindung der Sonden an die Oberfläche photochemisch, chemisch oder enzymatisch wieder spaltbar ist;
 - b) man hybridisiert eine zu untersuchende Nukleinsäure an diese Sonden;
 - c) man verändert die Sonden in einer allelspezifischen enzymatischen Reaktion;
 - d) man entfernt einen Teil der Sonden, der für die Analyse der allelspezifischen Reaktion bedeutungslos ist;
 - e) man analysiert die allelspezifischen Produkte anhand der nachweisbaren Markierungen und führt eine Bestimmung der vorhandenen Allele in der abgefragten Nukleinsäureprobe durch.
2. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Adresse der Oberfläche in Schritt a) die Position (Oligonukleotidarray), eine Farbe, eine Fluoreszenzmarkierung, eine isotopische Markierung, eine chemische Markierung oder eine radioaktive Markierung ist.
3. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden Oligonukleotide, modifizierte Oligonukleotide, peptide nucleic acids (PNAs), Chimäre dieser Verbindungsklassen oder andere Substanzen sind, die sequenzspezifisch mit DNA wechselwirken.
4. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Sonden über reversible Bindungssysteme an die Oberfläche bindet.
5. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchende Nukleinsäuren in Schritt b) genomische DNA, klonierte DNA, cDNA, RNA, PCR Produkte oder Ligationsprodukte sind.
6. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templat mittels einer Polymerase und Nukleotidbausteinen zu spezifischen Produkten, entsprechend Anspruch 1c) umgesetzt werden.
7. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man durch gleichzeitigen Einsatz von Desoxy- und Didesoxynukleotidbausteinen eine Sequenzierung durchführt und nicht nur Polymorphismen detektiert.

8. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templat mittels einer Ligase und einem phosphorylierten Oligonukleotid zu spezifischen Produkten, entsprechend Anspruch 1c) umsetzt.
9. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templat mittels eines Helferoligonukleotids und einer strukturalaktiven Endonuklease allelspezifisch schneidet.
10. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man die allelspezifischen Produkte mittels Massenspektrometrie analysiert.
11. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder Elektrospray Ionisations Massenspektrometrie zur Analyse verwendet wird.
12. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die allelspezifischen Produkte in einer Art vorliegen, die sich besonders gut zur massenspektrometrischen Analyse eignen.
13. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die allelspezifischen Produkte gemäss Anspruch 1d) mittels einer enzymatischen oder chemischen Methode verkürzt.
14. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die besonders gute Eignung zur massenspektrometrischen Analyse dadurch zustande kommt, dass die allelspezifischen Produkte netto einfach positiv oder einfach negativ geladen sind.
15. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass eine chemische Reaktion zur Neutralisierung von Ladungen eingesetzt wird, die ansonsten zu einer neutralen oder mehrfach negativen Nettoladung des Produktes beitragen würden.
16. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man Phosphatgruppen, Thiophosphatgruppen, oder Dihiophosphatgruppen des Oligonukleotidrückgrats durch eine selektive Alkylierungsreaktion ladungsneutralisiert.
17. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die einfache Ladung von Anspruch 13 dadurch zustande kommt, dass man eine chemische Funktion einbringt, welche die Ladung trägt.
18. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach den Ansprüchen 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die reversible Bindungsschemie von Anspruch 4 durch einen induzierten Bruch die einfache Ladung zum Produkt aus Anspruch 13 beisteuert.
19. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 18, dadurch ge-

kennzeichnet, dass der induzierte Bindungsbruch chemisch oder photochemisch zustande kommt.

20. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der induzierte Bindungsbruch während eines Desorptionsprozesses des Analysevorgangs stattfindet.

21. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach den Ansprüchen 10 bis 20 dadurch gekennzeichnet, dass man eine Matrix auf die Oberfläche aufbringt, welche die Desorption im MALDI Prozess unterstützt.

22. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der induzierte Bindungsbruch durch die Matrix induziert wird.

23. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach den Ansprüchen 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass auf einem adressierten Analysepunkt der Oberfläche eine Vielzahl von unterschiedlichen Sonden sind.

24. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass allelspezifische Produkte der Sonden durch die allelspezifische Reaktion nach Anspruch 1c) nach Abspaltung von der Oberfläche in der Analyse eine eindeutige Masse als nachweisbare Markierung ergeben.

25. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass allelspezifische Produkte der Sonden durch die allelspezifische Reaktion nach Anspruch 1c) nach Abspaltung von der Oberfläche in der Analyse ein eindeutiges Muster von Fragmentmassen als nachweisbare Markierung ergeben.

26. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach mindestens einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Massen aller Produkte oder Produktfragmente der allelspezifischen Reaktionen einen eindeutigen Rückschluss auf die in der abgefragten Nukleinsäure vorhandenen Allele zulassen.

27. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass bekannte Polymorphismen in der zu untersuchenden DNA genotypisiert werden.

28. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass man unbekannte Polymorphismen in der zu untersuchenden DNA identifiziert.

29. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man Cytosin-Methylierungen detektiert und visualisiert.

30. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die chemische Behandlung der DNA mit einer Bisulfitlösung (Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt.

31. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels der Polymerasereaktion (PCR) erfolgt.

32. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen nach Anspruch 26 dadurch gekennzeichnet, dass bekannte Methylierungsmuster in

der zu analysierenden Probe nach der in Anspruch 30 vorbehandelten DNA untersucht werden.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 1a

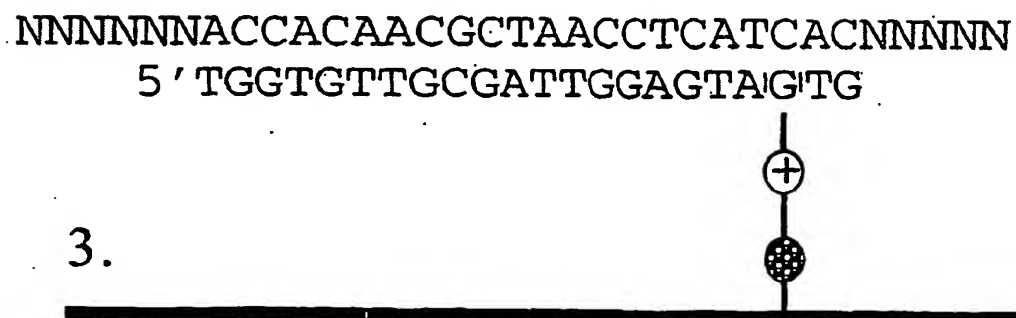
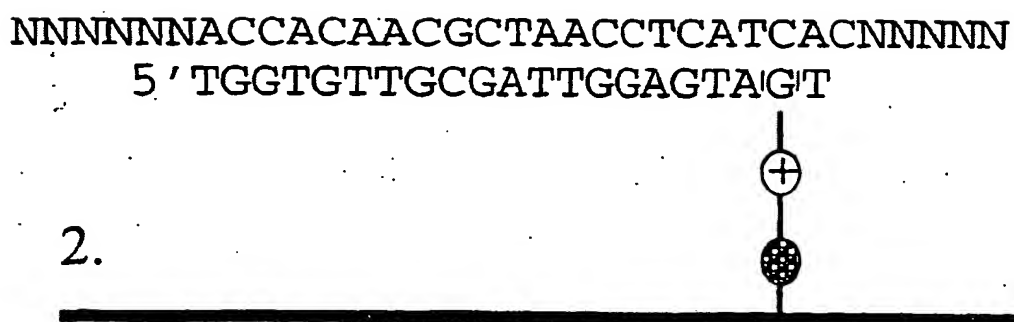
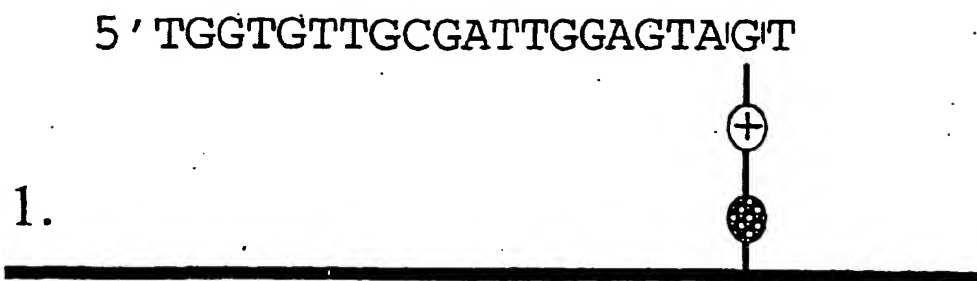


Fig. 1b

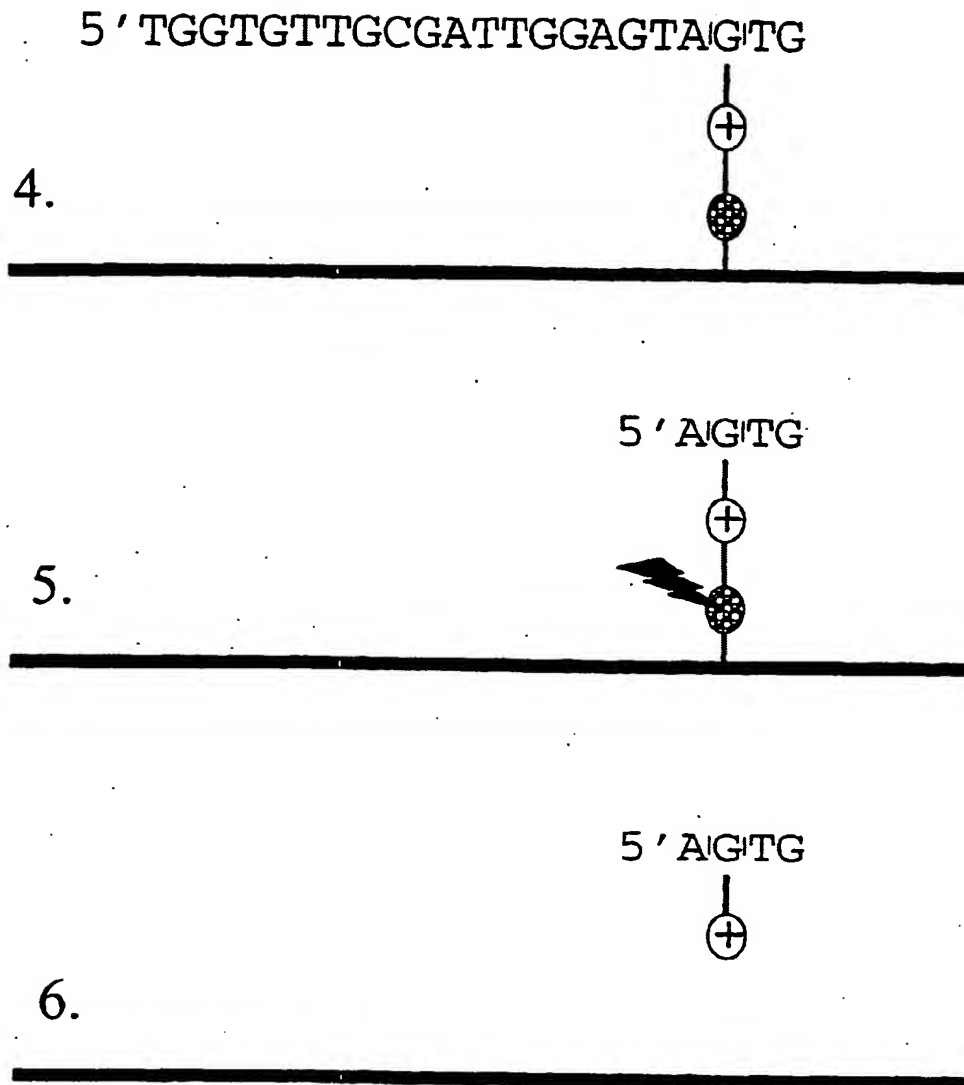
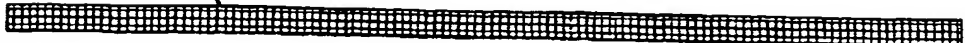


Fig. 2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.